

网络出版时间:2014-10-16 14:02
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.11.089.html

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.11.089

道地产区不同牛膝种群的遗传多样性分析

孔德政¹, 张 伟², 李 永¹

(1 河南农业大学 林学院, 河南 郑州 450002; 2 信阳师范学院 生命科学学院, 河南 信阳 464000)

【摘 要】 【目的】对道地产区河南 8 个野生牛膝种群叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列的变化进行分析, 研究牛膝种群的遗传多样性, 为牛膝野生种群的保护提供依据。**【方法】**选取河南 8 个野生牛膝种群(信阳鸡公山种群、信阳灵山种群、南阳淮源种群、南阳大乘山种群、洛阳龙峪湾种群、南阳老界岭种群、新乡九莲山种群、新乡万仙山种群)为材料, PCR 扩增其叶绿体多态性片段 *psbA-trnH*, 分析其在供试 8 个牛膝野生种群中的差异, 并据此分析各种群的遗传多样性。**【结果】**从 8 个牛膝种群的叶绿体片段中得到 6 个单倍型(I~VI), 其中单倍型 I 为祖先单倍型, 与其他单倍型仅差 1 个突变步。牛膝单倍型多样性指数为 0.594, 核苷酸多样性指数为 2.13×10^{-3} 。牛膝种群遗传距离与地理距离之间不存在正相关关系。淮源种群的遗传多样性最高, 且有特殊的基因型 II 和 V; 九莲山种群具有特殊的基因型 VI。**【结论】**道地产区河南野生牛膝种群的遗传多样性相对较低; 淮源种群与九莲山种群应该作为保护单元受到更多的重视。

【关键词】 牛膝; 道地产区; 遗传多样性; 河南

【中图分类号】 Q346+.5; R282.71 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2014)11-0151-05

Genetic diversity of different *Achyranthes bidentata* (Amaranthaceae) populations in genuine producing area

KONG De-zheng¹, ZHANG Wei², LI Yong¹

(1 College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 College of Life Science, Xinyang Normal University, Xinyang, Henan 464000, China)

Abstract: 【Objective】 This study analyzed the changes of cpDNA *psbA-trnH* sequence of 8 wild *Achyranthes bidentata* populations in genuine producing area in Henan, and investigated the population genetic diversity to improve the conservation of *Achyranthes bidentata*. **【Method】** Eight wild *A. bidentata* populations (Jigong Mountain, Ling Mountain, Huaiyuan Mountain, Dachen Mountain, Longyuwan Mountain, Laojieling Mountain, Jiulian Mountain and Wanxian Mountain) in Henan were selected as research materials. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the cpDNA polymorphism region *psbA-trnH*. The differences between the 8 populations were analyzed and genetic diversity of each population was investigated. **【Result】** Six haplotypes (I – VI) were identified from cpDNA fragments of the 8 studied populations, among which haplotype I was ancestry while other haplotypes differed by one mutation step. The h and π of the species were 0.594 and 2.13×10^{-3} , respectively. There was no positive correlation between genetic distance and geographical distance in *A. bidentata* populations. Huaiyuan had the highest genetic diversity and unique haplotypes II and V, and Jiulian Mountain had unique haplotype VI. **【Conclusion】** Genetic diversity of wild *A. bidentata* populations in genuine producing area in Henan was low and more attention should be paid to populations Huaiyuan and Jiulian Mountain as conservation units.

【收稿日期】 2014-01-01

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31100272); 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2011B220004)

【作者简介】 孔德政(1964—), 男, 江苏高淳人, 教授, 博士, 主要从事园林植物遗传育种研究。E-mail: kdz217@sohu.com

【通信作者】 李 永(1980—), 男, 河南新乡人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事保护遗传学研究。E-mail: liyongrui1@163.com

Key words: *Achyranthes bidentata*; geo-authentic product area; genetic diversity; Henan Province

牛膝(*Achyranthes bidentata* Bl.)为苋科(Amaranthaceae)牛膝属(*Achyranthes* L.)多年生草本植物,是中医临床常用传统药材之一,以干燥根入药。其道地产区位于河南地区,产于河南的牛膝为怀牛膝,药效最好,是我国著名的四大怀药之一^[1]。牛膝对多种疾病有很好的治疗效果,生牛膝可活血、通经,治产后腹痛、月经不调、闭经、难产、尿血、淋病、鼻衄、虚火牙痛、脚气水肿、喉痹、痈肿和跌打损伤;熟牛膝有补肝肾、强筋骨之功效,可治腰膝骨痛,四肢拘挛、萎痹、肝肾亏虚和跌打瘀痛。由于牛膝根的药用价值高且经济效益好,市场需求量逐年增加,但是牛膝的栽培面积较小,药材市场供不应求。在经济利益的驱使下,对野生牛膝的掠夺式采挖愈演愈烈,严重破坏了道产区牛膝的野生资源,因此急需对其采取保护措施。

表 1 供试道地产区牛膝种群的基本信息

Table 1 Detailed information of tested *Achyranthes bidentata* populations in genuine producing area

种群 Population code	经度 Longitude	纬度 Latitude	样本数 Sample size	种群 Population code	经度 Longitude	纬度 Latitude	样本数 Sample size
信阳鸡公山(JG) Jigong Mountain,Xinyang	114.07°	31.83°	9	洛阳龙峪湾(LY) Longyuwan Mountain,Luoyang	111.76°	33.70°	10
信阳灵山(LS) Ling Mountain,Xinyang	114.24°	31.91°	7	南阳老界岭(LJ) Laojieling Mountain,Nanyang	111.77°	33.63°	6
南阳淮源(HY) Huaiyuan Mountain,Nanyang	113.29°	32.41°	9	新乡九莲山(JL) Jiulian Mountain,Xinxiang	113.61°	35.54°	8
南阳大乘山(DC) Dachen Mountain,Nanyang	113.02°	33.25°	10	新乡万仙山(WX) Wanxian Mountain,Xinxiang	113.63°	35.73°	9

1.2 *psbA-trnH* 基因的 PCR 扩增与测序

使用上海生工柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒(SK8262)提取牛膝基因组 DNA,操作流程按试剂盒说明书进行。用 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量。

参考文献[4],选用 *psbA-trnH* 片段的通用引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应在 MJ Research PTC-200 PCR 仪(美国伯乐公司)上进行,扩增反应体系为 30 μ L,包括 30 ng 基因组 DNA,10 mmol/L dNTPs(天根生化科技有限公司) 0.6 μ L,10 μ mol/L 通用引物^[4](华大基因科技股份有限公司合成)0.9 μ L,3 μ L *Taq* Buffer 和 1 U *Taq* 酶(天根生化科技有限公司)。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 40 s,52 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 8 min。PCR 产物经试剂盒 E. Z. N. A[®] Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek)纯化后送华大基因科技股份有限公司测序。将所得到的叶绿体基因 *psbA-trnH* 序列用 ClustalX1.81^[5]软件进行序列比

以往对牛膝的研究主要集中于其药理和生化方面^[2-3],对于牛膝遗传多样性和保护生物学方面的研究尚未见报道。因此,本试验以牛膝道地产区河南省境内的 8 个野生牛膝种群为对象,选用叶绿体基因片段 *psbA-trnH*^[4]对其种群的遗传变异情况进行分析,以期阐明其遗传多样性水平,为牛膝野生种群的保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取河南 8 个牛膝野生种群,每个种群随机采集 6~10 个个体,个体间距保持 10 m 以上,共采集 68 个个体,采样地信息见表 1。采取牛膝当年萌发的新叶,放在保鲜袋中,用硅胶干燥,带回实验室后置于-70 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中保存备用。

对,并进行人工校正,然后适当地剪切使每条序列前后端对齐。

1.3 数据分析

采用 DnaSP version4.0 软件估算单倍型多样性指数(h)^[6]和核苷酸多样性指数(π)^[7],评估道地产区 8 个牛膝野生种群的总体及种群遗传多样性,并用此软件估算种群间的基因流(N_m)与分化系数(Φ_{st})。应用 ARLEQUIN 软件包(Version 3.1)中的分子变异分析 AMOVA(Analysis of Molecular Variance)检测种群间和种群内的遗传变异组成。用 Phylip 软件对 8 个种群的遗传关系进行分析,计算出叶绿体基因核酸间的净差异^[8],采用邻接法(Neighbor-joining)构建严格一致性树。用 TCS 软件进行单倍型的系统关系分析,构建网络树。应用 IBD(Isolation-by-distance)软件分析牛膝种群平均遗传距离与地理距离(经纬度)之间的相关性,并进行 1 000 次重复的显著性检验。

对牛膝叶绿体基因片段进行 Tajima's D ^[9]和

Fu & Li's D^* 、 F^* ^[10] 检测,判断这些位点是否符合中性进化模式,以鉴定牛膝种群大小的历史变化。为了进一步验证牛膝的种群历史变化,假设种群恒定为零,进行失配分布分析(Mismatch distribution analysis),以推测种群是否经历过扩张或瓶颈效应^[8,11]。中性检验与失配分布分析均用 DnaSP version4.0 软件进行。

2 结果与分析

2.1 不同牛膝种群的遗传多样性分析

试剂盒提取的 DNA 产物经电泳检测,条带清晰明亮,可以用于 PCR 扩增。

对 68 个牛膝个体叶绿体基因片段 *psbA-trnH* 进行 PCR 扩增和测序,获得了 332 bp 的目的片段,

表 2 不同牛膝种群叶绿体基因片段 *psbA-trnH* 位点变化产生的 6 个单倍型信息

单倍型 Haplotype	核酸位置 Nucleotide position				
	161	207	228	300	330
I	C	G	C	G	A
II	C	G	A	G	A
III	A	G	C	G	A
IV	C	T	C	G	A
V	C	G	C	A	A
VI	C	G	C	G	C

表 3 基于叶绿体基因 *psbA-trnH* 的不同牛膝种群的遗传多样性指数

Table 3 Genetic diversity indexes of different <i>Achyranthes bidentata</i> populations based on cpDNA <i>psbA-trnH</i>							
种群 Population code	单倍型 多样性指数 Haplotype diversity	核苷酸 多样性指数 Nucleotide diversity	单倍型 (个体数) Haplotypes (No. of individuals)	种群 Population code	单倍型 多样性指数 Haplotype diversity	核苷酸 多样性指数 Nucleotide diversity	单倍型 (个体数) Haplotypes (No. of individuals)
JG	0.389	1.17×10^{-3}	I (7), IV (2)	LY	0.378	1.20×10^{-3}	I (8), III (1), IV (1)
LS	0.571	1.72×10^{-3}	I (3), III (4)	LJ	0.600	1.81×10^{-3}	I (3), IV (3)
HY	0.806	3.68×10^{-3}	I (2), II (3), IV (1), V (3)	JL	0	0	VI (8)
DC	0	0	I (10)	WX	0	0	I (9)

2.2 不同牛膝种群的遗传进化关系

分子变异分析结果表明,8 个种群间的遗传变异为 49.07%,而种群内的遗传变异为 50.93%,种群分化系数为 0.499,表明牛膝的遗传变异在种群内与种群间大致相当,种群间分化水平稍低,种群间基因流较高($N_m=0.25$)。由图 2 可以看出,九莲山种群(JL)与其他 7 个种群有较大分化,鸡公山种群(JG)、龙峪湾种群(LY)、大乘山种群(DC)和万仙山种群(WX)的亲缘关系最近。IBD 分析检验表明,牛膝种群遗传距离与地理距离相关性较低($r=0.091$),不存在正相关关系($P>0.05$)。

该片段存在 5 个碱基替代位点,有 I ~ VI 6 个单倍型(表 2),将其 DNA 序列提交至 GenBank,依次获得 JQ621856~JQ621861 6 个登录号。由表 3 可见,单倍型 I 个体数最多,有 42 个;单倍型 II、V 个体数最少,仅有 3 个。单倍型 I 分布最广,存在于 7 个种群;单倍型 IV 次之,存在于 4 个种群;单倍型 II、V、VI 分布范围较窄,只出现于 1 个种群。为了进一步阐明单倍型 I ~ VI 的系统关系,本研究构建了单倍型的网络树,结果见图 1。由图 1 可见,单倍型 I 为祖先单倍型,位于网络树中间位置,与其他单倍型仅差一个突变步。对 8 个野生种群 68 个牛膝个体进行计算,其单倍型多样性指数为 0.594,核苷酸多样性指数为 2.13×10^{-3} 。淮源牛膝种群(HY)的遗传多样性水平明显高于其他 7 个种群(表 3)。

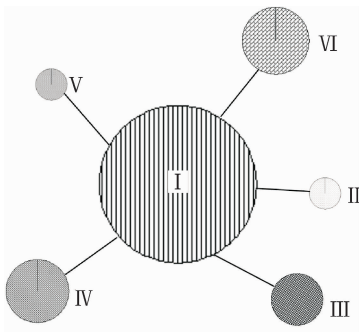


图 1 基于叶绿体基因 *psbA-trnH* 的不同牛膝种群单倍型 I ~ VI 系统关系的简明网络图

Fig. 1 Schematic diagram of cpDNA *psbA-trnH* haplotypes I ~ VI in different *Achyranthes bidentata* populations

2.3 不同牛膝种群的历史变化分析

对 8 个牛膝种群进行中性检验, Tajima's D 值为负值, 但不显著 ($D = -0.734, P > 0.10$); Fu & Li's D^* 、 F^* 均为正值, 且均不显著 ($D^* = 1.070, P > 0.10$; $F^* = 0.579, P > 0.10$)。失配分布分析结

果(图 3)同样支持牛膝种群没有快速增长, 失配分布并未显著偏离种群恒定零假设 ($r = 0.152, P = 0.264$)。结果表明, 该片段符合中性进化模式, 在整体水平上牛膝种群并未经历过瓶颈效应或快速扩张等历史事件。

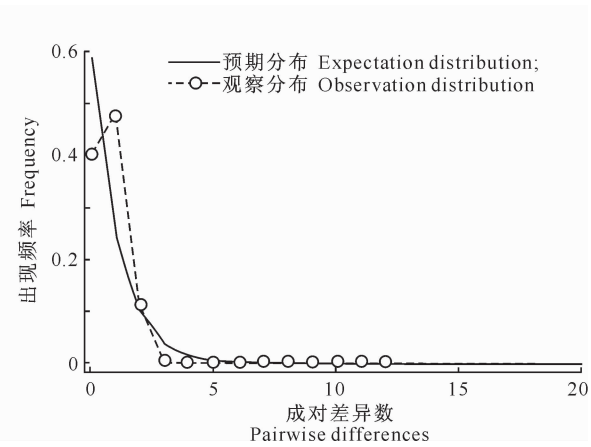
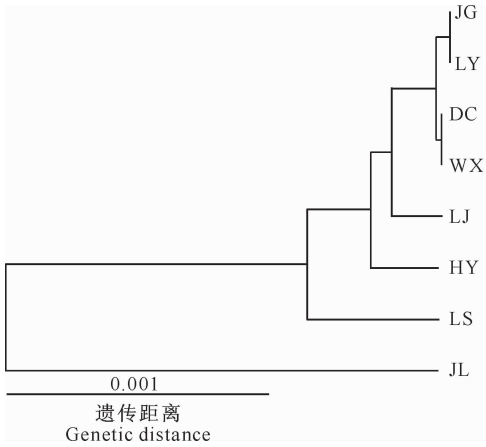


图 2 基于叶绿体基因 *psbA-trnH* 的不同牛膝种群进化关系的邻接树

图 3 基于叶绿体基因 *psbA-trnH* 的牛膝种群历史变化的失配分布分析

Fig. 2 Phylogenetic neighbor-joining tree of different *Achyranthes bidentata* populations based on cpDNA *psbA-trnH*

Fig. 3 Mismatch distribution analysis of historical demographic processes of *Achyranthes bidentata* populations based on cpDNA *psbA-trnH*

3 讨论

遗传多样性是生物所携带的遗传信息的总和, 是物种长期进化的结果。一个种群遗传多样性越高或越丰富, 其适应环境的能力就越强^[11]。影响植物遗传多样性的因素很多, 如地理分布范围、繁育系统、种群大小等^[12]。异交和混交物种一般比自交物种有更高的遗传多样性, 地理分布范围广的物种比分布范围狭窄的物种遗传多样性高, 大种群比小种群的遗传多样性高^[12-15]。

上会造成种群隔离、生境破碎化, 且对传粉者有较大的影响, 从而增加了种群的近交系数, 使种群有较高的遗传同源性, 从而导致遗传多样性的丢失, 最终形成干扰较多的地区牛膝种群遗传多样性较低的格局。

牛膝是广泛分布于中国暖温带及亚热带地区的多年生草本植物, 种群规模很大, 是以昆虫传粉为主的兼性传粉植物^[16], 理论上而言应该具有较高的遗传多样性。本试验对道地产区河南牛膝种群的遗传多样性进行研究, 结果发现, 其遗传多样性 ($h = 0.594$) 较 Qiu 等^[17]研究的中国其他种子植物低 (10 个物种平均, $h = 0.817$)。这可能是因为道地产区牛膝遭到大规模的采挖, 种群数量有所下降; 另一个原因可能是采样范围狭小, 如果进一步扩大采样区域, 其遗传多样性指数可能会上升。本研究结果显示, 淮源种群 (HY) 牛膝的遗传多样性 ($h = 0.806, \pi = 3.68 \times 10^{-3}$) 明显高于其他 7 个种群, 这可能与淮源种群受人为干扰程度较小有关。人为干扰很大程度

本研究结果表明, 道地产区牛膝种群间有很低的遗传分化 ($\Phi_{ST} = 0.499$)。供试牛膝种群间基因流较高 ($N_m = 0.25$), 这可能是由于叶绿体基因由种子进行传播, 而成熟的牛膝种子往往有刺状的小萼片宿存^[17], 此类种子多靠动物进行传播, 其传播距离较远, 所以种群间基因流较高。牛膝九莲山种群 (JL) 与其他 7 个种群有较大分化, 鸡公山种群 (JG)、龙峪湾种群 (LY)、大乘山种群 (DC) 和万仙山种群 (WX) 4 个种群的亲缘关系最近, 但这 4 个种群的地理距离反而相对较远。IBD 分析也进一步证明, 遗传距离与地理距离相关性较低 ($r = 0.091$), 不存在正相关关系 ($P > 0.05$)。这可能是由于牛膝种子的结构特殊, 使种子具有高效的传播效率, 导致在小范围内种群遗传距离与地理距离之间相关性较低。

8 个牛膝种群有 6 个单倍型 (I ~ VI), 单倍型 I 与其他单倍型仅差一个突变步, 亲缘关系相当。单倍型 I 为祖先单倍型且分布最广, 存在于 7 个种

群,仅在九莲山种群(JL)未出现。一般来讲,亲缘关系近的单倍型在同一地区或种群中出现的概率较大,而 JL 种群是一个较为特殊的现象,其在道地产区中具有特殊的基因型,应该受到更多的保护。淮源种群(HY)的遗传多样性明显高于其他 7 个种群,且有特殊的单倍型Ⅱ和Ⅴ,也应该作为一个保护单元受到更多的重视。

总之,本研究结果表明,道地产区河南野生牛膝种群的遗传多样性相对较低;人类活动较多的地区可能会造成牛膝种群的遗传多样性降低;牛膝种群遗传距离与地理距离之间不存在正相关关系;淮源种群(HY)与九莲山种群(JL)应该作为保护单元受到更多的重视。

[参考文献]

[1] 张贵君.常用中药鉴定大全[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版,1993:156-158.
Zhang G J. Complete collection of identification of Chinese materia medica in common use [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Publishing House, 1993; 156-158. (in Chinese)

[2] 鲁磊,冯锋,柳文媛,等.怀牛膝成分的分离与鉴定[J].药学与临床研究,2007,15(3):202-204.
Lu L, Feng F, Liu W Y, et al. Studies on chemical constituents from *Achyranthes bidentata* Blume [J]. Pharmaceutical and Clinical Research, 2007, 15(3): 202-204. (in Chinese)

[3] Amritral A, Sanjiv D, Shankap K A. Mini review of valuable ethno medicinal plant-*Achyranthes bidentata* Blume [J]. Journal of Pharmacy Practice, 2011, 1(1): 1-3.

[4] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America, 2005, 102(23): 8369-8374.

[5] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.

[6] Nei M, Tajima F. Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data [J]. Genetics, 1983, 105(1): 205-217.

[7] Nei M. Molecular evolutionary genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987.

[8] Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees [J]. Molecular Biology Evolution, 1993, 10(3): 512-526.

[9] Slatkin M, Hudson R R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations [J]. Genetics, 1991, 129(2): 555-562.

[10] Rogers A R, Harpending H C. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences [J]. Molecular Biology Evolution, 1992, 9(3): 552-569.

[11] 钱迎倩,马克平,生物多样性研究的原理和方法[M].北京:中国科学技术出版社,1994:123-140.
Qian Y Q, Ma K P. The principles and methods of biodiversity research [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1994: 123-140. (in Chinese)

[12] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species [M]//Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, et al. Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1989: 43-64.

[13] Hamrick J L, Godt M J W. Conservation genetics of endemic plant species [M]//Avisé J C, Hamrick J L. Conservation Genetics. New York: Chapman and Hall, 1996: 281-304.

[14] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman-Broyles S L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species [J]. New Forests, 1992, 6(1/2/3/4): 95-124.

[15] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. Molecular Ecology, 2004, 13(5): 1143-1155.

[16] 李金亭.牛膝结构和发育与主要药用成分积累关系及其道地性形成机制的研究[D].西安:西北大学,2008.
Li J T. Studies on the correlation between the structural development of *Achyranthes bidentata* BL. and the accumulation of major medicinal components together with its forming of genuineness [D]. Xi'an: Northwest University, 2008. (in Chinese)

[17] Qiu Y X, Fu C X, Comes H P. Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: Tracing the genetic imprints of quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2011, 59(1): 225-244.